



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> :</b>  <b>A61K</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 00/61067</b>  <b>(43) Date de publication internationale:</b> 19 octobre 2000 (19.10.00)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR00/00938  <b>(22) Date de dépôt international:</b> 12 avril 2000 (12.04.00)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 99/04610                      13 avril 1999 (13.04.99)                      FR 99/16633                      29 décembre 1999 (29.12.99)                      FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).  <b>(72) Inventeur; et</b> <b>(75) Inventeur/Déposant (US seulement):</b> LORET, Erwann [FR/FR]; 1, boulevard des Iles d'Or, F-13009 Marseille (FR).  <b>(74) Mandataires:</b> MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
<b>(54) Title:</b> ANTI-HIV 1 VACCINE COMPRISING THE ENTIRE OR PART OF THE TAT HIV-1 PROTEIN  <b>(54) Titre:</b> VACCIN ANTI-VIH-1 COMPRENANT TOUT OU PARTIE DE LA PROTEINE TAT DE VIH-1  <b>(57) Abstract</b>  The invention relates to an anti HIV 1 vaccine comprising the entire or part of the Tat HIV 1 protein, in addition to the identification of said protein in individuals affected by HIV. The Tat protein is a protein of the HIV1 Oyi variant.  <b>(57) Abrégé</b>  La présente invention a pour objet un vaccin anti-VIH-1 comprenant tout ou partie de la protéine Tat de VIH ainsi que la mise en évidence de cette protéine chez des individus infectés par le VIH. En particulier, la protéine Tat est celle du variant VIH-1 Oyi.		

### *UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION*

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## VACCIN ANTI-VIH-1 COMPRENANT TOUT OU PARTIE DE LA PROTEINE TAT DE VIH-1

La présente invention a pour objet un vaccin anti-VIH-1 comprenant tout  
5 ou partie de la protéine Tat de VIH-1 ainsi que la préparation d'anticorps  
monoclonaux ou polyclonaux aptes à reconnaître plusieurs variants de Tat et un  
procédé de détection de Tat dans un échantillon biologique.

L'objet de la présente invention concerne l'utilisation d'une protéine de  
régulation du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), la protéine Tat, comme  
10 vaccin contre ce virus ainsi que la mise en évidence de cette protéine chez des  
individus infectés par le VIH.

Tat est une protéine virale essentielle pour l'expression des gènes viraux et  
la réplication du virus VIH-1. Le gène Tat est composé de deux exons codant pour  
une protéine de 99 à 106 résidus en fonction des isolats. Cependant une activité  
15 Tat avec des formes à 86 résidus ayant une partie de l'extrémité C terminale  
délétée a déjà été décrite. Ces dérivés Tat de 86 résidus seraient des artéfacts de  
laboratoire ou des formes ancestrales qui n'existent plus à l'état naturel. Cette  
protéine permet l'activation des gènes du VIH-1 grâce à sa fixation sur une cible  
nucléotidique appelée TAR localisée à l'extrémité 5' des ARNm de VIH-1. Elle  
20 est sécrétée par les cellules infectées par le VIH et est indispensable pour une  
transcription réverse efficace de VIH-1. Une fois à l'extérieur de la cellule, elle est  
capable d'activer des cellules infectées éloignées et d'induire l'immunodéficience de  
cellules T non infectées. En outre, elle est directement impliquée dans des  
pathologies liées au SIDA, comme le sarcome de Kaposi.

25 La mise au point du vaccin contre le SIDA est très attendue au niveau  
planétaire mais l'obtention d'un vaccin contre le SIDA présente deux difficultés  
majeures. La première est liée à l'extrême variabilité de la protéine d'enveloppe  
GP120. La deuxième difficulté est due au fait que des anticorps anti-GP120  
semblent aggraver la maladie pour des patients ayant un SIDA déclaré. Toutefois

des résultats préliminaires indiquent qu'un effet protecteur pourrait être possible avec des anticorps anti-GP120 chez des personnes n'étant pas contaminées au préalable. Une phase II avec un vaccin anti-GP120 a été lancée par la société Roche aux Etats Unis. Les cohortes sélectionnés pour cette phase II sont bien  
5 suivis au niveau médical. Il sera toutefois difficile d'obtenir une surveillance médicale équivalente lorsque le vaccin sera commercialisé.

Avec la GP120, Tat est détectée dans le sang de patients contaminés par le VIH-1. Les macrophages et lymphocytes T cytotoxiques (LTC) chargés d'éliminer toutes les cellules contaminées par un virus ont leur activité progressivement  
10 bloquée par Tat, qui agit donc comme un immunosuppresseur.. Des anticorps anti-Tat (ou des principes actifs ciblant Tat) devraient permettre la restauration de l'activité des LTC et des macrophages.

Tat est donc une cible privilégiée aussi bien pour le développement d'antiviraux anti Tat que pour une approche vaccinale.

15 La protéine Tat a donc déjà fait l'objet d'expérimentations. En particulier, des essais précliniques, obtenus avec une protéine Tat recombinante biologiquement inactive (Tat toxoïde), ont montré que Tat toxoïde entraîne, chez les patients séronégatifs une forte et persistante production d'anticorps anti-Tat (Le Buanec et al., 1998). Chez des patients séropositifs et immunodéficients une  
20 augmentation significative du taux d'anticorps anti-Tat est observé par rapport au taux normal d'anticorps anti-Tat (Westendorp et al., 1995).

Cette Tat toxoïde est une protéine recombinante qui est rendue biologiquement inactive après la carboxyméthylation des cystéines de Tat. Les inventeurs ont pu produire également une Tat carboxyméthylée (Tat Bru cmC) et  
25 ils ont observé également une perte de l'activité de transactivation alors que le même variant Tat avec les cystéines libres (Tat Bru fC) est capable de transactiver. Tat Bru cmC est capable de se fixer sur TAR avec une affinité comparable à Tat Bru fC.

Un inconvénient majeur dans l'utilisation comme vaccin de Tat carboxyméthylée est que la modification chimique des cystéines entraîne des changements conformationnels que les inventeurs ont observé par dichroïsme circulaire et RMN. Bien que des changements conformationnels existent parmi les différents variants Tat, la carboxyméthylation des cystéines entraîne des modifications majeures dans le repliement de la chaîne peptidique de Tat qui, de ce fait, n'est pas un bon candidat pour la préparation d'un vaccin anti-Tat.

Il convient par conséquent d'utiliser dans un vaccin anti-VIH-1 une protéine Tat défectueuse mais possédant les caractéristiques structurales similaires aux Tat fonctionnelles. Cette Tat devrait en effet présenter une structure tridimensionnelle la plus proche possible des protéines Tat naturelles, de façon à être capable d'induire une réponse immunitaire similaire à celle induite par les Tat naturelles, mais ne pouvant pas transactiver, c'est-à-dire, comme précédemment indiqué, incapable d'activer des cellules infectées éloignées et induire l'immunodéficience de cellules T non infectées. Il est en effet crucial d'inhiber cette immunodéficience.

La présente invention a donc pour objet un vaccin anti-VIH-1 comprenant tout ou partie d'au moins une protéine Tat de VIH-1 capable de se fixer sur TAR et incapable de transactiver, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable et, le cas échéant, un ou plusieurs adjuvant(s) de l'immunité approprié(s). Cette protéine Tat doit être capable de générer, chez un animal chez qui cette protéine serait administrée, une production d'anticorps capables de reconnaître d'autres variants de cette protéine et selon un taux suffisant pour inhiber la transactivation desdits variants.

Ainsi, non seulement une protéine Tat peut être utilisée pour la préparation d'un vaccin conforme à l'invention mais également seulement une ou plusieurs partie(s) de cette protéine susceptible(s) de remplir les fonctions recherchées pour la protéine Tat dans le cadre de la présente invention. Le susdit vaccin peut

également comprendre une combinaison de différentes protéines Tat ou encore des parties de protéines Tat différentes.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, la protéine Tat, lorsqu'elle est utilisée dans son intégralité, comprend de préférence de 99 à 106  
5 acides aminés et encore plus préférentiellement 101 acides aminés.

Par « partie de la protéine Tat » on entend tout fragment ou combinaison de fragments d'une ou plusieurs protéine(s) Tat appartenant ou non au même variant, suffisamment immunogène pour donner lieu à une production d'anticorps. De préférence, ledit fragment comprend entre 15 et 30 acides aminés, de  
10 préférence entre 18 et 25 acides aminés. Cette définition est valable à chaque fois que cette expression est utilisée dans la présente demande.

La protéine Tat susceptible d'être utilisée dans le vaccin conforme à l'invention doit donc être différente des protéines Tat fonctionnelles dites « naturelles », c'est-à-dire extraites de différentes souches de VIH-1 présentes à  
15 l'état naturel, de façon à être incapable de transactiver tout en se fixant sur TAR. C'est la raison pour laquelle, les Tat utilisées dans le vaccin conforme à l'invention présentent une séquence nucléotidique ayant au moins une mutation par rapport à la séquence nucléotidique d'une Tat fonctionnelle. Cette mutation, généralement ponctuelle, peut par exemple donner lieu à la suppression, l'ajout ou substitution  
20 d'un ou plusieurs acide(s) aminé(s).

Dans le cadre de leurs travaux, les inventeurs ont tout d'abord étudié le variant Tat correspondant à l'isolat Bru (86 résidus) puis ont synthétisé cinq autres variants représentatifs chacun de la diversité structurale observée avec cette protéine (Grégoire et Loret, 1996) : Tat Z2 (86 résidus), Tat Mal (87 résidus), Tat  
25 Eli (99 résidus), Tat Oyi (101 résidus) et Tat Jr (101 résidus). 6 groupes structuraux parmi tous les isolats de VIH-1 ont ainsi été déterminés en fonction de la taille des protéines et de la nature de leurs mutations. Il était vraisemblable que tous ces variants avaient des activités pharmacologiques similaires à Tat Bru qui a été synthétisée deux fois, avec les cystéines carboxyméthylées (Tat Bru cmC) et

ensuite avec les cystéines libres (Tat Bru fC). La chimie utilisée est de type fastFmoc avec l'activateur HBTU. La purification des protéines a été effectuée par chromatographie liquide haute performance. Il s'est avéré que toutes ces protéines synthétiques sont capables de se fixer sur TAR mais de grandes disparités se sont  
5 révélées dans le test de transactivation sur cellule HeLa. Le résultat le plus surprenant fut l'absence de transactivation observée avec le variant Tat Oyi. Aucune transactivation n'a été observée non plus avec le dérivé Tat Bru possédant les cystéines carboxyméthylées. L'étude par dichroïsme circulaire (CD) en phase aqueuse de ces protéines synthétiques montre bien que la modification chimique  
10 de Tat Bru cmC a modifié de manière significative la structure de Tat Bru. Par contre Tat Oyi a une structure similaire aux autres comme l'atteste son spectre CD.

La souche VIH-1 Oyi a été identifiée chez un patient Gabonais (plus précisément une femme enceinte) en 1988 (Huet et al., 1989). Ce patient, bien que  
15 séropositif depuis plusieurs années, était en parfaite santé. Apparemment, le fait d'avoir une protéine Tat défectueuse dans cette souche VIH-1, a empêché l'évolution vers un SIDA chez ce patient et lui a conféré une immunité contre le virus du SIDA. En effet, les études épidémiologiques effectuées sur le terrain ont montré que les patients infectés par le VIH-1 Oyi étaient des non progressseurs à  
20 long terme.

La souche VIH Oyi appartient au sous-type B correspondant aux souches VIH-1 les plus répandues en Europe et en Amérique du Nord. La femme gabonaise chez laquelle la souche VIH Oyi a été identifiée appartenait à un groupe de 31 personnes localisées dans la province rurale du Haut Ogooué dans le sud est  
25 du Gabon. Ce groupe avait été identifié en 1986 lors d'une analyse séro-épidémiologique effectuée sur environ 2 000 personnes infectées dans l'ensemble du Gabon. Ce groupe du Haut Ogooué avait attiré l'attention car les personnes infectées étaient en bonne santé et présentaient également un profil Western Blot tout à fait atypique. En effet, il n'était pas possible de détecter, chez ces

personnes, la présence d'anticorps anti *gp* 120, *gp* 160 et *gp* 41 alors que les anticorps anti *gag* et *pol* étaient identifiés (Huet et al., 1989).

Un groupe de 750 femmes enceintes, originaires de cette même province du Haut Ogooué, fut ensuite étudié et révéla que 25 d'entre elles (soit 3,3 %) étaient VIH-positives en test ELISA. Parmi ces 25 femmes, 23 avaient un profil Western Blot atypique caractéristique de la région (voir ci-dessus). Une dizaine de femmes a été suivie pendant 2 ans dont celle possédant la souche VIH-1 Oyi. Pendant cette période, le profil sérologique atypique resta constant excluant la possibilité d'une infection récente qui n'aurait pas laissé le temps à la formation d'anticorps anti *gp* 120. La présence d'une infection au VIH-2 fut exclue car il n'y avait pas de réaction à *gag* VIH-2 et uniquement 2 cas de contamination VIH-2 avaient été reportés au Gabon, localisés dans une région littorale. Tous les patients suivis restèrent en bonne santé avec aucune perte de poids ou maladie opportuniste pendant les 2 années de l'étude (Huet et al., 1989).

La femme identifiée Oyi était d'origine rurale, en bonne santé et séronégative pour HTLV-1 et VIH-2. La co-culture de ses lymphocytes avec des PPMC révéla une activité RT seulement après 15 jours, ce qui est très inhabituel. Le virus avait également une activité cytopathique presque indécélable. Bien que du surnageant de culture permettait l'infection de PBMC, pratiquement aucune répllication ne fut possible sur des lignées lymphocytaires normales comme les H-9 et CEM ou encore des monocytes U-937. Pour valider cette analyse, des résultats similaires furent observés avec 17 autres patients de la même région confirmant l'absence d'anticorps anti *gp* 120 dans tous les cas. Il est intéressant de constater que le sérum d'un donneur VIH-1 normal est capable de reconnaître la *gp* 120 de VIH-1 Oyi (Huet et al., 1989). Le virus VIH-1 Oyi a donc été cloné, le séquençage ne révéla aucune anomalie à l'exception du gène *Tat* (Huet et al., 1989).

La mutation de Cys 22 en Ser semble être la raison de la perte de la transactivation et la réversion de cette mutation permet de restaurer l'activité *Tat*.



Par ailleurs, il a été constaté qu'en l'absence de Tat, la reproduction du virus est possible mais à un niveau très faible. Il existe donc un rapport étroit entre la virulence du VIH et l'efficacité de transactivation de Tat. Cette étude épidémiologique montre encore une fois le lien étroit qui existe entre la mortalité de cette maladie et le taux de réplication du VIH. Tat semble donc permettre au VIH d'atteindre le taux de réplication qui transforme cette infection virale en maladie mortelle.

De plus, cette étude de ces patients atypiques de la région du Haut Ogooué a révélé la protection que semblerait procurer les souches VIH défectueuses vis-à-vis des souches VIH normales. En effet, des analyses par PCR de lymphocytes fraîchement prélevés chez plusieurs patients atypiques auraient révélé la présence de souches VIH normales. Le mécanisme de protection ne fait pas intervenir des anticorps anti *gp* 120, lesquels sont absents chez ces patients. L'action des lymphocytes T cytotoxiques pourrait être le mécanisme qui a permis l'éradication du virus.

Une étude épidémiologique relativement récente faite au Gabon (Delaporte et al., 1996) indique un faible pourcentage de personnes infectées par le VIH (2 à 3 %) par rapport à d'autres pays africains. Le sous-type Oyi semble avoir complètement disparu de la population et la femme gabonaise chez qui la souche VIH-1 Oyi avait été prélevée était en parfaite santé en 1995 et avait donné naissance à 3 enfants, tous séronégatifs. Le virus VIH-1 Oyi n'était plus détectable chez elle.

La protéine Tat du variant VIH-1 Oyi semble donc être le meilleur candidat pour entrer dans la composition d'un vaccin anti-VIH-1. Cependant, une Tat inactive n'est pas nécessairement immunogène. Or tout l'intérêt d'un vaccin est de générer la production d'anticorps qui plus est, dans le cas présent, des anticorps actifs à l'encontre d'autres variants de Tat. De façon surprenante, les Inventeurs ont pu faire cette démonstration. Le vaccin conforme à l'invention

comprend donc, selon un mode de réalisation particulièrement intéressant, la Tat, en tout ou en partie, du variant VIH-1 Oyi.

Les avantages d'un vaccin anti-Tat peuvent même être envisagés à plusieurs niveaux. Chez les patients asymptomatiques, il serait possible de retarder  
5 la progression vers le SIDA en limitant l'immuno-déficience. Un tel vaccin pourrait permettre au patient de conserver une immunité efficace contre le virus, comme cela semble être le cas au début de l'infection. En particulier, la restauration de l'activité des lymphocytes T cytotoxiques (LTC) et des macrophages, qui ne sont pas infectés par le VIH mais dont l'activité est inhibée  
10 par Tat, pourrait avoir pour conséquence de permettre aux patients de devenir non progressseurs.

Chez les patients ayant un SIDA déclaré, un vaccin anti Tat pourrait limiter l'incidence de certaines pathologies tel que le sarcome de Kaposi ou des syndromes neurologiques qui semblent être liés à une action directe de la protéine  
15 Tat suite à leur sécrétion par les cellules infectées par le VIH.

L'intérêt du variant VIH-1 Oyi dans le cadre de la présente invention est d'ailleurs confirmé par les expériences de Western Blot (photographies de gel non montrées dans la présente demande) et le test Elisa réalisés par les Inventeurs afin de déterminer s'il existait des reconnaissances croisées entre les différents variants  
20 de Tat.

En effet, dans ces deux types d'expérimentation, trois sérums différents anti-Tat ont été testés à l'encontre de sept variants Tat.

Les Inventeurs ont immunisé des lapins avec Tat Oyi, Tat Bru cmC et Tat Eli selon un protocole d'immunisation classique en présence d'adjuvant de Freund.  
25 Les sérums polyclonaux obtenus après 53 jours ont été analysés en western blot et en test Elisa. Les titres observés sont respectivement de 700, 11 et 660 pM pour les anticorps anti Oyi, Bru cmC et Eli.

Dans des conditions dénaturantes, les expériences de werstern blot montrent que le sérum anti-Tat Oyi et le sérum anti-Tat Eli sont incapables de

montrer une immogénicité croisée avec tous les variants comme c'est le cas avec le sérum anti-Tat Bru cmC.

Tat Bru cmC est un variant dont les cystéines sont carboxyméthylées. Cette modification chimique des cystéines entraîne non seulement la perte de l'activité de transactivation (Péloponèse et al., 1999) mais également la perte de la structure 3D de ce variant qui se transforme en pelote statistique (résultat non publié). Il n'est donc pas surprenant de constater que le sérum anti-Tat Bru cmC est capable de reconnaître tous les variants lorsqu'ils sont dénaturés.

Dans des conditions non dénaturantes, le test Elisa (Figure 7) montre que le sérum anti-Tat Oyi est capable de reconnaître tous les variants comme le sérum anti-Tat Bru cmC. Par contre le sérum anti-Tat Eli est toujours incapable de reconnaître tous les variants. Il semble donc qu'il existe des épitopes 3D conservés chez de nombreux variants Tat. Toutefois, seul le caractère immunogénique particulier de Tat Oyi permet de générer ces anticorps en grande quantité. Il y a donc une forte probabilité pour que la présence de Tat chez les patients ait été sous-estimée jusqu'à présent. La dilution des trois sérums est de 1/1000. Dans la même expérience mais sans dilution, le sérum anti-Tat Eli peut également reconnaître tous les autres variants Tat. Il est intéressant de constater que l'acétylation de la lysine 50 de Tat Bru (Tat Bru K50) permet une reconnaissance par le sérum anti-Tat Eli à faible concentration.

Ces expériences effectuées avec ces trois sérums polyclonaux de lapin confirment donc l'intérêt de Tat Oyi comme vaccin. De plus, le sérum anti-Tat Oyi est capable d'inhiber la transactivation sur cellules HeLa avec Tat Bru ou Tat Eli. Le sérum anti-Tat Eli utilisé comme témoin montre que la production d'anticorps à partir d'un variant même actif ne garantit pas la reconnaissance croisée de tous les variants Tat comme cela est observé avec Tat Oyi. Tat Oyi, qui est un variant long (101 résidus), permet une meilleure reconnaissance des variants Tat par rapport à Tat Bru cmC qui est un variant court (86 résidus). Les souches HIV-1 avec des variants Tat courts ont pratiquement disparu et semble avoir été un

artéfact de laboratoire (Jeang et al., 1999). De plus, le sérum anti-Tat Oyi présente une grande spécificité puisqu'il ne reconnaît plus les formes dénaturées (ou épitopes linéaires) des variants Tat. A l'inverse, le risque n'est pas négligeable pour le sérum anti-Tat Bru cmC de générer des anticorps auto-immuns chez l'être  
5 humain, du fait de la grande diversité structurale de Tat Bru cmC. Les Inventeurs ont observé en effet que dans le sérum anti-Tat Bru cmC il existait des anticorps capables de reconnaître l'albumine humaine (données non montrées).

La préservation de la structure tridimensionnelle d'au moins un épitope de Tat est donc essentielle à la reconnaissance d'autres variants de Tat par les  
10 anticorps anti-Tat 3D.

Par ailleurs, les Inventeurs ont également montré que les anticorps anti-Tat Oyi étaient capables d'inhiber la transactivation des protéines Tat Eli.

La présente invention a donc également pour objet un procédé de préparation d'anticorps anti-Tat monoclonaux ou polyclonaux aptes à reconnaître  
15 plusieurs variants de Tat. En effet, il est à souligner que ces anticorps peuvent donc être utilisés afin de détecter, chez les individus susceptibles d'avoir été infectés par le VIH, la présence de la protéine Tat dans leur sang quel qu'en soit le variant.

La présente invention concerne donc un procédé de préparation  
20 d'anticorps polyclonaux anti-Tat aptes à reconnaître plusieurs variants de Tat, comprenant :

- l'immunisation d'un animal au moyen d'une protéine Tat ou partie de cette protéine Tat associée à un adjuvant de la réponse immunitaire,
- la purification des anticorps spécifiques contenus dans le sérum des  
25 animaux immunisés.

L'immunisation de l'animal peut être effectuée par tout mode d'introduction de la protéine Tat ou partie de cette protéine Tat dans cet animal telle que : injection, inhalation, administration orale, sous cutanée intradermique, intrapéritonéale, intraveineuse ou intramusculaire.

L'immunisation de l'animal peut également être effectuée au moyen d'une expression *in vivo* et *in situ* d'un vecteur portant non seulement la séquence de la protéine Tat en tout ou partie mais également tout le système nécessaire à l'expression de la protéine Tat selon des techniques bien connues de l'homme du  
5 métier.

La purification des anticorps spécifiques contenus dans le sérum des animaux immunisés peut par exemple être effectuée sur une colonne d'affinité sur laquelle la protéine ou partie de la protéine ayant servi d'antigène a été préalablement fixée.

10 Selon un mode de réalisation avantageux de la présente invention, la protéine Tat ou partie de la protéine Tat utilisée dans l'étape d'immunisation du susdit procédé correspond au variant Oyi ou au variant Bru cmC.

Selon un autre mode de réalisation de la présente invention, la susdite protéine est une protéine synthétisée chimiquement.

15 La position de sept résidus cystéine (région 22-37) est très conservée parmi tous les variants Tat et l'importance de 6 de ces résidus cystéine pour la transactivation est largement décrite dans la littérature (Jeang, 1996)

Par conséquent, il est tout à fait envisageable de muter un variant Tat sur au moins l'une de ces cystéines afin de rendre ledit variant incapable de  
20 transactiver tout en ayant les propriétés recherchées dans le cadre de la présente invention. Cette mutation peut par exemple consister en une substitution de la cystéine en un autre acide aminé tel qu'une sérine ou une alanine.

Les Inventeurs, par la détermination de la structure 3D de Tat Bru par RMN 2D hétéronucléaire, ont par ailleurs identifié une région cible qui devrait être  
25 conservée chez les variants Tat. Cette cible est constituée en partie par la région N-terminale et la région basique de la séquence de Tat.

La structure 3D du variant Tat Bru montre que la région riche en cystéines est proche de l'espace tridimensionnel de la région N-terminale et de la région basique. Ceci indique que la carboxyméthylation des cystéines modifie

probablement la structure de cette cible et confirme le fait que la Tat ainsi modifiée ne peut être considérée comme un candidat potentiel pour la préparation d'un vaccin anti-VIH.

Par ailleurs, les inventeurs ont réalisé la synthèse chimique en phase solide des différentes protéines Tat. Au stade actuel des connaissances dans le domaine, les avantages présentés par ce mode de synthèse résident dans les coûts de production moindres, les meilleurs rendements par rapport à la Tat produite par biologie moléculaire et l'absence de contaminations.

Ainsi, de manière avantageuse, la Tat mise en œuvre dans le vaccin conforme à l'invention est préparée par synthèse chimique et plus particulièrement par synthèse chimique en phase solide, telle qu'une synthèse de type FMOC et de préférence fastFMOC. Un procédé de synthèse mettant en œuvre des groupes protecteurs de ce type est également un objet de la présente invention.

Cependant, la Tat mise en œuvre dans le vaccin conforme à l'invention peut également être synthétisée d'une toute autre manière, par exemple au moyen de techniques recombinantes bien connues de l'homme du métier. Ces systèmes de clonage et d'expression utilisés dans le cadre de ces techniques peuvent être issus de microorganismes tels que *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Streptomyces* et *Saccharomyces* mais également à partir de cellules de levure, d'insectes et de mammifères. Les systèmes d'expression à partir de *Baculovirus* sont également envisageables. Bien évidemment, les vecteurs portant la séquence de la protéine Tat en tout ou partie comprendront tout le système d'expression nécessaire pour ce faire, selon des techniques bien connues de l'homme du métier.

De plus, afin d'éviter tout risque potentiel de toxicité du fait du passage de la protéine Tat, en particulier Tat Oyi, dans les membranes, il conviendrait de modifier la séquence Arg-Gly-Asp présente en C-terminal de la séquence de tous les variants Tat. Cette séquence est en effet essentielle pour le passage membranaire car elle reconnaît un récepteur membranaire à la surface des cellules (Jeang, 1996). Plus particulièrement, cette modification pourrait consister en la

substitution de cette séquence par la séquence Lys-Ala-Glu ce qui n'aurait pas d'influence sur la structure, ou éventuellement par la séquence Ala-Ala-Ala.

Comme indiqué plus haut, il est très probable que l'on ait sous-estimé jusqu'à présent le nombre de personnes infectées par le VIH faute d'avoir pu  
5 déceler chez elles, par exemple dans leur sang, la présence de la protéine Tat. L'intérêt de la présente invention est de fournir les moyens de déceler le plus grand nombre possible de variants Tat au moyen d'un nombre restreint d'anticorps.

L'invention a donc également pour objet un procédé de mise en évidence  
10 de la présence de la protéine Tat ou d'une partie de la protéine Tat dans un échantillon biologique, comprenant :

- la mise en contact dudit échantillon avec des anticorps anti-Tat capables de donner lieu à des complexes antigène-anticorps avec plusieurs variants de Tat,
- 15 - la détermination de la présence des complexes antigène-anticorps.

Par « anticorps anti-Tat », on entend non seulement des anticorps entiers mais également des fragments d'anticorps ou anticorps chimériques capables de remplir la fonction recherchée dans le cadre de la présente invention, à savoir reconnaître tout ou partie de la protéine Tat.

20 La détermination de la présence des complexes antigène-anticorps se fait selon des méthodes bien connues de l'homme du métier. En particulier, les réactifs permettant la détection de ces complexes peuvent porter un marqueur ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où l'anticorps utilisé n'est pas marqué.

25 La mise en contact de l'échantillon biologique dans le procédé conforme à l'invention avec des anticorps anti-Tat peut également être effectuée avec un sérum anti-Tat.

Par « échantillon biologique » on entend tout échantillon liquide, cellulaire ou tissulaire prélevé chez un patient et susceptible de contenir l'antigène apte à

réaliser un complexe antigène-anticorps en présence du ou des anticorps approprié(s). De préférence, cet échantillon biologique est du sang.

Enfin, la présente invention a également pour objet une trousse de diagnostic de l'infection par le VIH par la détermination de la présence de la protéine Tat ou d'une partie de la protéine Tat dans un échantillon biologique, comprenant :

- des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à la réaction immunologique,
- des réactifs permettant la détection des complexes antigène-anticorps produit par la réaction immunologique,
- éventuellement, un échantillon biologique de référence (témoin négatif) dépourvu d'antigène,
- éventuellement, un échantillon biologique de référence (témoin positif) contenant une quantité prédéterminée d'antigènes.

Selon un mode de réalisation avantageux de la présente invention, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique comprennent des anticorps anti-Tat capables de donner lieu à des complexes antigènes-anticorps avec plusieurs variants Tat et de préférence comprennent des anticorps anti-Tat Oyi, anti-Tat Bru cmM ou une combinaison des deux.

## FIGURES

Figure 1 : Comparaison des différentes protéines Tat.

Les protéines Tat ont été réparties en 6 groupes structuraux qui sont mentionnés en gras sur la Figure 1A et soulignés sur la Figure 1B.

Figure 1A : Séquences en acides aminés des protéines Tat.

TatZ2 provient d'un isolat de VIH-1 proche des souches ancestrales du virus (Zhu et al., 1998). Tat Mal et Tat Eli proviennent d'une souche VIH-1 isolée pendant les années 80 en Afrique Centrale à l'occasion d'infections



hétérosexuelles à VIH (Alizon et al., 1986). Tat Br comprend la séquence la plus utilisée en laboratoire et provient d'une souche VIH-1 isolée en France (Barre-Sinoussi et al., 1983), tandis que Tat Jr provient d'un isolat VIH-1 américain (O'Brien et al., 1990). Tat Oyi est étroitement apparenté à Tat Jr et Tat Bru mais  
5 provient d'une souche VIH identifiée chez un patient sein au Gabon (Huet et al., 1989).

Figure 1B : Classification des protéines Tat en fonction de leur taille et des mutations qu'elles comprennent pour le programme MULTALIN (Corpet, 1989).

10

Figure 2 : Séquence de la protéine Tat du variant VIH-Oyi (décrite par Huet et al, 1989)

Figure 3 : Purification des 6 variants Tat par chromatographie liquide  
15 haute performance en phase reverse avec colonne greffée C8 à 280 nm (voir Matériels et Méthodes pour la procédure expérimentale).

Pour chaque cadre, le tracé inférieur représente le résultat de la synthèse peptidique avant purification, tandis que le tracé supérieur représente le résultat de la synthèse après la dernière étape de purification. Tat Bru (A), Tat Jr (B), Tat Z2  
20 (C), Tat Oyi (D), Tat Mal (E) et Tat Eli (F) ont été clivées à partir de la résine avec TFA. Après précipitation avec de l'éther de butyle méthyle, les protéines ont été dissoutes dans du Tampon TFA à 0,1 % (tracé inférieur dans chaque cadre). Pour chaque protéine, la purification a été effectuée avec 2 migrations HPLC sur colonnes Hybar Merk C8 (4,5 x 125 mm, débit 0,8 ml/min) semi-préparatives  
25 successives et ensuite les fractions pures ont été analysées (tracé supérieur de chaque cadre) et identifiées par spectrométrie de masse et par une analyse des acides aminés (données non montrées). Dans chaque cas, il s'avère que le pic principal HPLC représente la séquence complète. Les pics entre 10 et 15 min représentent des dérivés de 50 résidus tandis que les pics proches de la fraction

principale sont des dérivés avec 1 à 15 délétion(s) à partir de l'extrémité N-terminale. Les fractions hautement hydrophobes sont des dérivés avec un poids moléculaire élevé probablement dû aux chaînes latérales incomplètement déprotégées.

5

**Figure 4** : Mesure de la constance d'affinité des Tat synthétiques pour la cible nucléotidique TAR par électrophorèse (voir les tests de déplacement de mobilité électrophorétique dans Matériels et Méthodes.

La concentration protéique (ng/μl) est indiquée au sommet de chaque  
10 bande de gel. L'ARN libre ou complexé est identifié par *f* (pour free/libre) et *c* respectivement. La préparation du même ARN est utilisée pour la titration avec les 6 protéines. Un dérivé Tat Bru avec des cystéines carboxyméthylées (Bru CmC) a également été testé. Les constantes de dissociation à l'équilibre (*K<sub>d</sub>*) ont été mesurées directement à partir de tests de déplacement de mobilité  
15 électrophorétique. Les valeurs de *K<sub>d</sub>* varient approximativement de 50 nM pour Tat Eli et Tat Mal à environ 140 nM pour Tat Oyi et Tat Jr. De plus, les inventeurs ont noté qu'au-delà de la variation des valeurs de *K<sub>d</sub>*, les profils de liaison avec les diverses protéines sont quelques peu différents. Par exemple, des concentrations faibles de Tat Bru produisent un complexe simple bien résolu et ce  
20 n'est qu'avec des concentrations plutôt supérieures (> 4,5 ng/μl) que des agrégats se forment et ne peuvent pas pénétrer dans les gels d'acrylamide. Au contraire, des complexes multimères sont aisément identifiés avec Tat Eli même à de faibles concentrations. On peut voir jusqu'à 3 bandes retardées avec Tat Eli, dans une moindre mesure avec Tat Jr. De tels effets ne sont pas observés avec des protéines  
25 plus courtes telles que Tat Bru et Tat Mal par exemple, ainsi qu'avec Tat Oyi qui est une protéine plus longue.

**Figure 5** : Test de transactivation des protéines Tat synthétiques sur cellule HeLa. Ces cellules sont transfectées par le LTR du VIH-1 auquel est

associé un gène rapporteur LacZ. Le taux de protéine  $\beta$ -gal produit est proportionnel à la capacité de transactivation des différentes Tat synthétiques. Le LTR contient les séquences d'ADN en aval et en amont requises pour la transcription du VIH et TAR est présent au début de l'ARNm (Clavel et Charneau, 1994). Les cofacteurs cellulaires requis pour la transactivation du VIH sont présents dans les cellules HeLa. Sans Tat, il y a une expression basale de  $\beta$ -gal qui est indiquée comme contrôle (C). L'histogramme suivant montre la transactivation observée avec les différents variants de Tat utilisant 2 concentrations : 1  $\mu$ M (boîte gris clair) et 5  $\mu$ M (boîte gris foncé). Dans chaque case, Tat a été additionnée au tampon cellulaire et donc une expression de  $\beta$ -gal supérieure au contrôle signifie que la Tat synthétique est capable de traverser les membranes nucléaires et cytoplasmiques, de se lier à TAR et d'interagir avec des cofacteurs cellulaires. Seul Tat Bru cmC (donnée non montrée) et Tat Oyi sont déficientes dans cette expérimentation alors qu'elles se lient à TAR (Figure 1). Tat Mal et Tat Eli montrent un niveau de transactivation 3 à 4 fois supérieur à celui de Tat Bru. Tat Z2, le plus proche des protéines Tat ancestrales, présente un faible niveau de transactivation et l'évolution pourrait favoriser les isolats de VIH-1 avec une Tat plus efficace. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres tests de transfection utilisant la luciférase comme gène reporter et Tat Mal et Tat Eli à 1  $\mu$ M transactivaient bien le LTR à un niveau comparable à celui obtenu avec une Tat-pCMV transfectée (donnée non montrée). La gamme de concentrations utilisées dans les différentes expérimentations s'étend de 0,1  $\mu$ M à 10  $\mu$ M (donnée non montrée). A 0,1  $\mu$ M, seule Tat Eli montre un niveau de transactivation significativement supérieur au niveau de base. A 10  $\mu$ M, les 6 Tat montrent des niveaux de transactivation tellement élevés qu'il est impossible d'observer des différences entre elles en raison de la saturation.

**Figure 6** : Spectres dichroïques des variants Tat Z2 (triangle blanc), Tat

Oyi (triangle noir), Tat Bru (cercle blanc), Tat Bru cmC (pas de marque), Tat Jr (cercle noir), Tat Mal (carré blanc) et Tat Eli (carré noir).

Les spectres sont mesurés en tampon phosphate à 20 mM pH 4,5, ils sont enregistrés de 260 à 178 nm avec un trajet optique de 50  $\mu$ m. Les différences observées dans les spectres CD révèlent une hétérogénéité structurale entre les variants Tat quelle que soit leur taille. Il n'est pas possible de rassembler les spectres CD dans 2 catégories constituées des Tat courtes (marques blanches) et des Tat longues (marques noires). Les spectres CD sont caractérisés par une bande négative proche de 200 nm typique des structures non organisées. La magnitude intense de la bande de 200 nm observée avec Tat Bru cmC montre que la modification des cystéines a entraîné des changements conformationnels majeurs par rapport aux autres Tat.

**Figure 7** : Tests Elisa effectués avec trois dilutions de sérums polyclonaux de lapin (anti-Tat Bru cmC, anti-Tat Oyi et anti-Tat Eli) à l'égard de 7 variants de la protéine Tat dans les conditions dénaturantes.

**Figure 8** : Inhibition de la transactivation par Tat Eli avec les sérums anti-Tat Eli, anti-Tat Oyi et Tat Bru cmC.

La présente invention ne se limite pas à la description ci-dessus. Elle sera mieux comprise à la lumière des exemples qui ne sont mentionnés qu'à titre illustratif.

## **EXEMPLES**

### **1) MATERIELS ET METHODES CORRESPONDANT AUX FIGURES 3 A 6**

### Synthèse protéique, purification et caractérisation

Des peptides ont été assemblés selon la méthode de Barany et Merrifield (1980) sur une résine préchargée de divinylbenzène de 4-hydroxyméthyl-phénoxy-méthyl-copolystyrène à 1 % (HMP) (0,5-0,65 mmol) (Perkin Elmer, Applied Biosystem Inc., Forster City, CA) sur un synthétiseur automatisé (ABI 433A, Perkin Elmer, Applied Biosystem Inc., Forster City, CA). De façon à éviter l'obtention de dérivés présentant des délétions, les extrémités N-terminales sans Fmoc ont été protégées par un groupement acétyl après traitement par un mélange comprenant 4,75 % d'anhydride acétique (Merck), 6,25 % de DIEA à 2,0 M, 1,5 % de 1-hydroxybenzotriazol 1M (HOBt) (Perkin Elmer, Applied Biosystem Inc., Warrington, GB) et 87,5 % de N-méthylpyrrolidone (Perkin Elmer, Forster City, CA). Chaque étape de déprotection a été contrôlée avec un dispositif de conductivité. Les peptides ont été déprotégés et retirés de la résine avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) complémenté avec 10 % de méthyl-phényl-sulphide (Merck) et 5 % d'éthane dithiol (Merck). La purification a été réalisée avec un appareil de chromatographie liquide à haute performance de Beckman (HPLC) et une colonne en phase reverse C8 de Merck (10 x 250 mm). Le Tampon A était constitué d'eau avec 0,1 % de TFA et le Tampon B était constitué d'acétonitrile avec 0,1 % de TFA. Le gradient était constitué de Tampon B de 20 à 40 % en 40 min et un débit de 2 ml/min. Une spectrométrie de masse par électrovaporisation a été réalisée avec un PE-SCIEX API 150ex simple quad de Perkin Elmer. Des analyses d'acides aminés ont été réalisées sur un analyseur de Beckman, modèle 6300.

### Tests de déplacement de mobilité électrophorétique

Les 59 nucléotides de l'ARN de TAR contenant le renflement pyrimidine UUU essentiel a été préparé *in vitro* par transcription avec l'ARN polymérase T3. Les mélanges de réaction de liaison (20 µl) contenaient 0,2 nmole d'ARN de TAR radiomarqué, 0-100 ng de Tat dans un Tampon TK (50 mM de Tris pH 7,4,

20 mM de KCl, 0,1 % de Triton X-100). Les complexes ont été séparés de l'ARN non lié par électrophorèse sur des gels dénaturants de polyacrylamide à 8 % contenant 0,1 % de Triton X-100. Le gel a été pré-migré pendant 30 min avant le chargement de l'échantillon (25  $\mu$ l). L'électrophorèse s'est poursuivie pendant 5 90 min à environ 200 V. Les quantités relatives d'ARN libre et/ou lié ont été déterminées par imagerie au phosphore.

#### Dichroïsme circulaire (CD)

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été mesurés avec un trajet 10 optique de 50  $\mu$ m de 260 à 178 nm sur un spectrophotomètre CD UV de Jobin-Yvon (Long-Jumeau, FRANCE) (Mark VI). L'instrument a été calibré avec de l'acide (+)-10-camphorsulfonique. Un rapport de 2,1 a été trouvé entre la bande CD positive à 290,5 nm et la bande négative à 192,5 nm. Les données ont été collectées à 0,5 nm d'intervalle avec un taux de balayage de 1 nm par minute. Les 15 spectres CD ont été reportés sous forme de  $\Delta\epsilon$  par amide. Les échantillons ont été préparés dans un tampon phosphate à 20 mM (pH 4,5). Les concentrations protéiques étaient comprises dans une gamme de 0,5 à 1 mg/ml.

#### Transactivation avec des cellules transfectées par LTR de HIV

20 La transactivation fonctionnelle par une Tat synthétique a été déterminée en utilisant des cellules P4. Ces cellules CD4-HeLa portent le gène lacZ bactérien sous le contrôle de LTR de VIH et l'accumulation cytoplasmique de  $\beta$ -galactosidase est strictement dépendante de la présence de Tat. 80 % des cellules confluentes étalées sur une plaque à 12 puits ont été incubées pendant 24 h à 25 37°C, en présence de CO<sub>2</sub> à 5 %, avec la protéine Tat comprise dans un milieu DMEM supplémenté avec 0,1 % de BSA. Suite à cette période d'incubation, les cellules ont été lavées avec une solution saline tamponnée au phosphate et les protéines ont été extraites et analysées pour la  $\beta$ -galactosidase avec un test

d'immunoabsorption du commerce mettant en œuvre une enzyme liée à un antigène (ELISA pour  $\beta$ -galactosidase, Boehringer Mannheim, FRANCE), selon les instructions du fabricant. Les valeurs ont été normalisées au moyen de la concentration des protéines totales des différents lysats cellulaires comme  
5 déterminé par la méthode de Bradford.

### Inhibition de la transactivation

Les expérimentations ci-dessus de transactivation avec des cellules transfectées par LTR du VIH ont été reproduites mais cette fois avec ajout au  
10 milieu de culture soit d'un sérum anti-Tat Eli, soit d'un sérum anti Tat Oyi., soit d'un sérum anti Tat Bru. La protéine Tat provenait quant à elle des variants Eli.

Les inventeurs ont observés une inactivation de la transactivation par les anticorps anti-Tat Oyi de la protéine Tat Eli en comparaison notamment avec le milieu contrôle qui ne comprenait pas d'anticorps.

15

### 2) MATERIELS ET METHODES CORRESPONDANT A LA FIGURE 7

Les conditions d'immunisations sont une injection intradermique de 100  $\mu$ g de protéine Tat purifiée dans 0,5 ml de Tampon phosphate pH 4,5 100 mM plus 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund (Jour 0). Un premier rappel est effectué  
20 à J21 dans les mêmes conditions mais avec de l'adjuvant incomplet de Freund (0,5 ml). Un deuxième rappel est effectué à J42 identique à J41. Le sang est prélevé à J53 dans des tubes FST et le sérum est obtenu après centrifugation à 2000 tours/min. La dilution des sérums est 1/1000.

25

**Elisa :** Le test se fait sur une plaque Maxisorp U96 (Polylabo). Les protéines en tampon phosphate pH 4.5 sont incubées sur la plaque toute la nuit à 4°C. Après saturation en tampon MPBS (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/L, lait écrémé 5 % ajusté à pH 7,4 avec HCl), les

protéines sont incubées avec l'anticorps primaire de lapin pendant une heure. Ensuite incubation avec un anticorps de chèvre couplé à la peroxydase spécifique du fragment Fc de lapin (Cappel) pendant une heure. La révélation se fait en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de 100 mM acide citrique, 50 mM NaOH et 0,2 mg/ml ABTS (Boehringer). La lecture de l'absorbance se fait à 405 nm.

Sans dilution le sérum anti-Tat Eli est capable de reconnaître tout les variants ou dérivés Tat.

### **3) MATERIELS ET METHODES DU WESTERN BLOT**

10

**Western Blot :** Les protéines sont d'abord dénaturées en présence de 3 M Tris-HCl, pH 8,8, 5 %  $\beta$ -mercaptoéthanol, 2 % SDS, 10 % glycérol, et Bleu de bromophénol. Elles sont séparées par électrophorèse sur gel polyacrylamide 15 %. Les protéines sont ensuite transférées sur feuilles de nitrocellulose afin d'être révélées par immunodétection. Les sites aspécifiques sont bloqués par une solution PBS (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/L, ajusté à pH 7,4 avec HCl) contenant du lait écrémé 5 %. La feuille de nitrocellulose est mise à incuber avec l'anticorps primaire de lapin pendant une heure. Ensuite incubation avec un anticorps de chèvre couplé à la peroxydase spécifique du fragment Fc de lapin (Sigma). La révélation se fait en présence d'H<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>, PBS et diaminobezamidine. (Photographie du gel non montrée dans la présente invention).

15

20

### **4) MATERIELS ET METHODES CORRESPONDANT A LA FIGURE 8**

25

La transactivation est mesurée avec des cellules humaines HeLa transfectées avec le LTR du VIH-1 et un gène rapporteur de la protéine  $\beta$ -Galactosidase (Lac Z) selon le protocole décrit pour la figure 5.

Les sérums sont obtenus chez le lapin selon le protocole décrit pour la



figure 7.

Dans un milieu de culture de cellules, on ajoute 100 µl de trois sérums anti-Tat, à savoir anti-Tat Eli, anti-Tat Oyi et anti-Tat Bru cmC dans des dilutions croissantes, puis 100 µl du variant Tat Eli à 1 ou 5 µM. L'accumulation  
5 cytoplasmique de β-Galactosidase dépend donc de la présence de Tat.

Tout d'abord, on constate, à dilution équivalente, que le sérum anti-Tat Eli est le plus efficace. Ceci est logique car le sérum contient des anticorps produits à l'encontre du même variant que celui dont on cherche à neutraliser l'activité de transactivation. Cependant, il est à souligner que Tat Oyi est capable de générer  
10 des anticorps neutralisant de façon significative l'activité de transactivation de Tat Eli. Cette inhibition est d'ailleurs supérieure à celle observée notamment pour la dilution 1/10 au moyen du sérum anti-Tat Bru cmC. Ceci confirme l'intérêt des anticorps anti-Tat Oyi à l'encontre d'autres variants de Tat.

## REFERENCES

- Alizon, M., Wain-Hobson, S., Montagnier, L., & Sonigo, P. (1986) *Cell* **46**, 63-74
- 5 Barany, G. & Merrifield, R.B. (1980) in Gross, E., & Meinhofer, J. (Eds) *The peptide : Analysis, Synthesis, Biology. Academic Press, New York*, Vol. 2, pp 1-284
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S.,  
10 Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. (1983) *Science* **220**, 868-871
- Clavel, F. & Charneau, P. (1994) *J. Virol* **68**, 1179-1185
- 15 Corpet, F. (1989) *Nucl. Acid. Res.* **22**, 10881-10890.
- Delaporte E., Janssens W., Peeters M., Buve A., Dibanga G., Perret J.L., Ditsambou V., Mba J.R., Courbot M.C., Georges A., Bourgeois A., Samb B., Henzel D., Heyndrickx L., Fransen K., van der Groen G., Larouze B. (1996)  
20 *AIDS* **8**, 903-910
- Grégoire, C. & Loret, E.P. 1996. *J. Biol. Chem.* **271**, 22641-22646
- Huet, T., Dazza, M.C., Brun-Vezinet, F., Roelants, G.E. & Wain-Hobson, S.  
25 1989. *AIDS* **3**, 707-715
- Jeang, K.T. (1996) in Los Alamos National Laboratory (Ed) *HIV-1 Tat: Structure & Function*. Human Retroviruses & AIDS compendium. III, pp 3-18

Jeang, K. T., Xiao, H., & Rich, E. A. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 28837-28840.

5 Le Buanec, H., Lachgar, A., Bizzini, B., Zagury, J. F., Rappaport, J., Santagostino, E., Muca-Perja, M. & Gringeri, A. 1998. *Biomed. Pharmacother* 10, 431-435

O'Brien, W.A., Koyanagi, Y., Namazie, A., Zhao, J.Q., Diagne, A., Idler, K., Zack, J.A. & Chen, I.S. (1990) *Nature* 348, 69-73

10

Westendorp, M.O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K.M. & Krammer, P.H. 1995. *Nature* 375, 497-500

15 Zhu, T., Korber, B.T., Nahmias, A.J., Hooper, E., Sharp, P.M. & Ho, D.D. (1998) *Nature* 391, 594-597

### REVENDICATIONS

1. Vaccin anti-VIH-1 comprenant tout ou partie d'au moins une protéine Tat de VIH-1 capable de se fixer sur TAR et incapable de transactiver, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable et, le cas échéant, un ou plusieurs adjuvant(s) de l'immunité approprié(s).
2. Vaccin selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la protéine Tat comprend entre 99 et 106 acides aminés.
3. Vaccin selon la revendication 1 ou 2, caractérisé par le fait qu'il s'agit d'une Tat dont la séquence nucléotidique présente au moins une mutation par rapport à la séquence nucléotidique d'une Tat fonctionnelle.
4. Vaccin selon la revendication 3, caractérisé par le fait que la mutation porte sur au moins l'une des cystéine de la protéine Tat.
5. Vaccin selon les revendications 1 à 4, caractérisé par le fait qu'il s'agit de la Tat du variant VIH-1 Oyi ou partie de cette Tat.
6. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé par le fait qu'il s'agit d'une Tat synthétique chimique.
7. Vaccin selon la revendication 6, caractérisé par le fait que la Tat est synthétisée en phase solide.
8. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé par le fait qu'il s'agit d'une Tat recombinante.
9. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé par le fait qu'il contient un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique de Tat en tout ou partie et les éléments nécessaires à son expression.
10. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé par le fait qu'il comprend au moins la région N-terminale et/ou la région basique de la séquence de Tat.
11. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé par le fait

que la région Arg-Gly-Asp située à l'extrémité C-terminale de Tat est modifiée.

12. Procédé de préparation d'anticorps polyclonaux anti-Tat aptes à reconnaître plusieurs variants de Tat, comprenant :

- l'immunisation d'un animal par injection d'une protéine Tat ou partie de cette protéine Tat associée à un adjuvant de la réponse immunitaire,
- purification des anticorps spécifiques contenus dans le sérum des animaux immunisés.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la protéine Tat ou partie de la protéine Tat utilisée dans l'étape d'immunisation correspond au variant Oyi ou Bru cmC.

14. Procédé selon la revendication 12 ou 13, caractérisé en ce que la protéine Tat ou partie de la protéine Tat utilisée dans l'étape d'immunisation est telle que définie dans la revendication 6.

15. Procédé de mise en évidence de la présence de la protéine Tat ou d'une partie de la protéine Tat dans un échantillon biologique, comprenant :

- la mise en contact dudit échantillon avec des anticorps anti-Tat capables de donner lieu à des complexes antigène-anticorps avec plusieurs variants de Tat,
- la détermination de la présence des complexes antigène-anticorps.

16. Trousse de diagnostic de l'infection par le VIH par la détermination de la présence de la protéine Tat ou d'une partie de la protéine Tat dans un échantillon biologique, comprenant :

- des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à la réaction immunologique,
- des réactifs permettant la détection des complexes antigène-anticorps produits par la réaction immunologique,
- éventuellement, un échantillon biologique de référence (témoin négatif) dépourvu d'antigène,
- éventuellement, un échantillon biologique de référence (témoin positif)

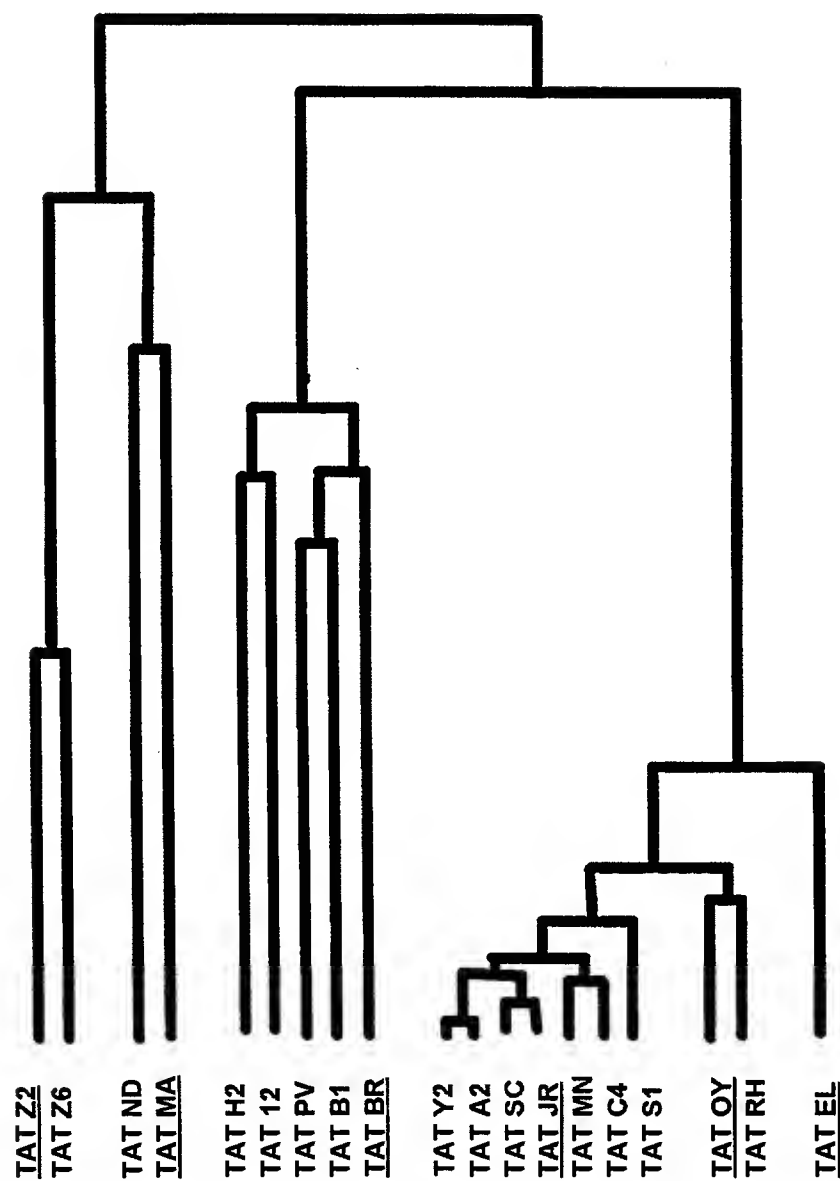
contenant une quantité prédéterminée d'antigène.

17. Trousse selon la revendication 16, dans laquelle les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique comprennent des anticorps tels que définis dans la revendication 15.

18. Procédé de synthèse d'un variant Tat tel que défini dans l'une des revendications 1 à 5, 10 et 11, caractérisé en ce qu'il met en œuvre des groupements protecteurs de type FMOC, de manière préférentielle de type fastFMOC.

TAT_HV1Z2	1	MDPVDNIEPWNHFGSQPKTACNRCHCKCCYHCQVCFETKGLGISYGRKRRORRRRQGGGTHQDPIPKQPSQPRGDP	10	20	30	40	50	60	70	80	90	86
TAT_HV1Z6		.....L.....										86
TAT_HV1ND		.....L.S.....										86
TAT_HV1MA		.....L.....										87
TAT_HV1H2		.....RL.....										86
TAT_HV112		.....RL.....										86
TAT_HV1PV		.....RL.....										86
TAT_HV1B1		.....RL.....										86
TAT_HV1BR		.....RL.....										86
TAT_HV1Y2		.....L.....										86
TAT_HV1A2		.....L.....										101
TAT_HV1SC		.....RL.....										101
TAT_HV1JR		.....SL.....										101
TAT_HV1MN		.....RL.....										101
TAT_HV1C4		.....RL.....										101
TAT_HV1S1		.....RL.....										101
TAT_HV1OY		.....RL.....										101
TAT_HV1RH		.....RL.....										102
TAT_HV1EL		.....L.....										99

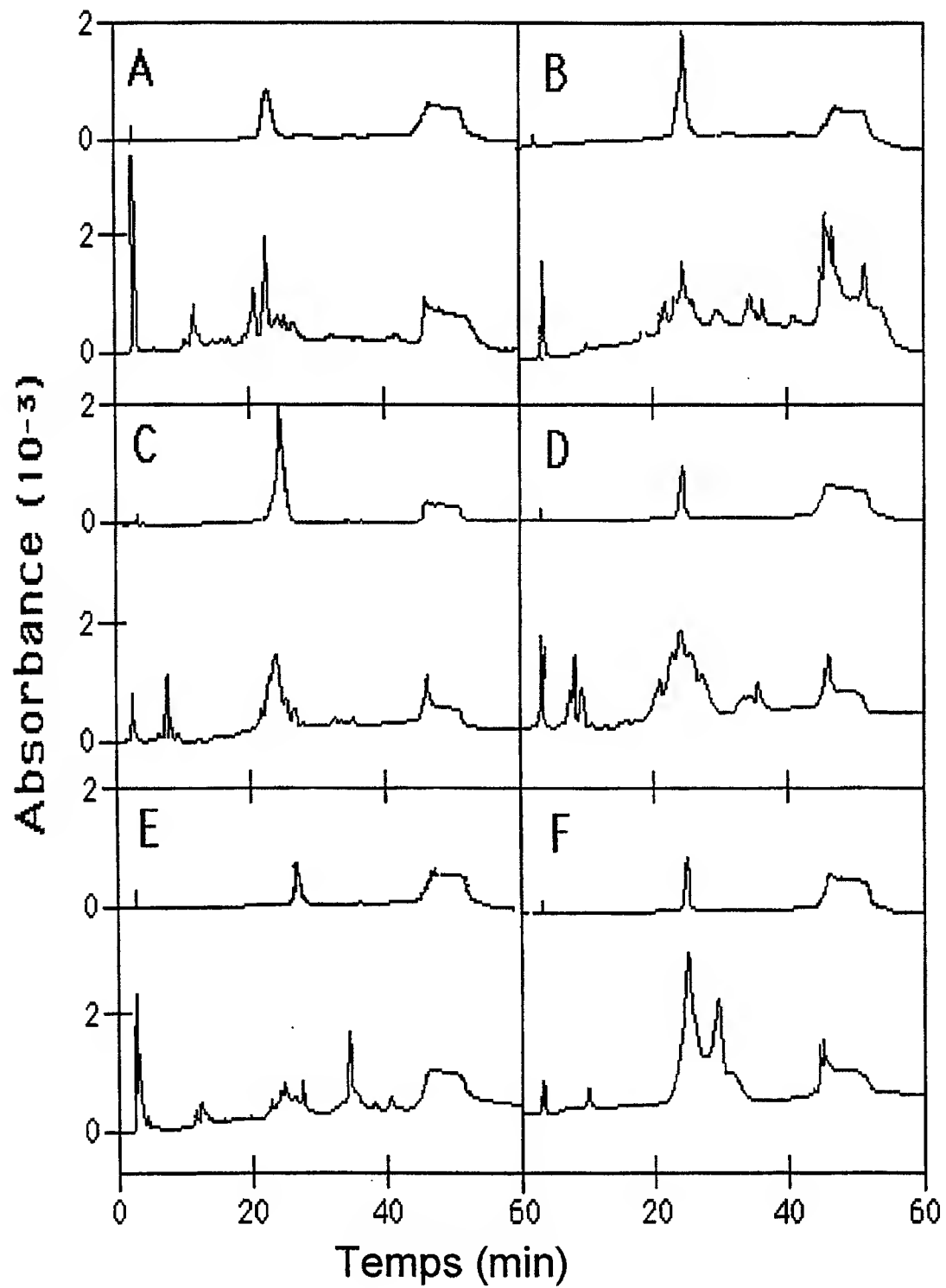
FIGURE 1A

**FIGURE 1B**



H-Met-Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-His-Pro-  
Gly-Ser-Gln-Pro-Lys-Thr-Ala-Ser-Asn-Asn-Cys-Tyr-Cys-Lys-  
Arg-Cys-Cys-Leu-His-Cys-Gln-Val-Cys-Phe-Thr-Lys-Lys-Gly-  
Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-  
Arg-Ala-Pro-Gln-Asp-Ser-Lys-Thr-His-Gln-Val-Ser-Leu-Ser-  
Lys-Gln-Pro-Ala-Ser-Gln-Pro-Arg-Gly-Asp-Pro-Thr-Gly-Pro-  
Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Lys-Val-Glu-Arg-Glu-Thr-Glu-Thr-Asp-  
Pro-Glu-Asp-OH

**FIGURE 2**

**FIGURE 3**

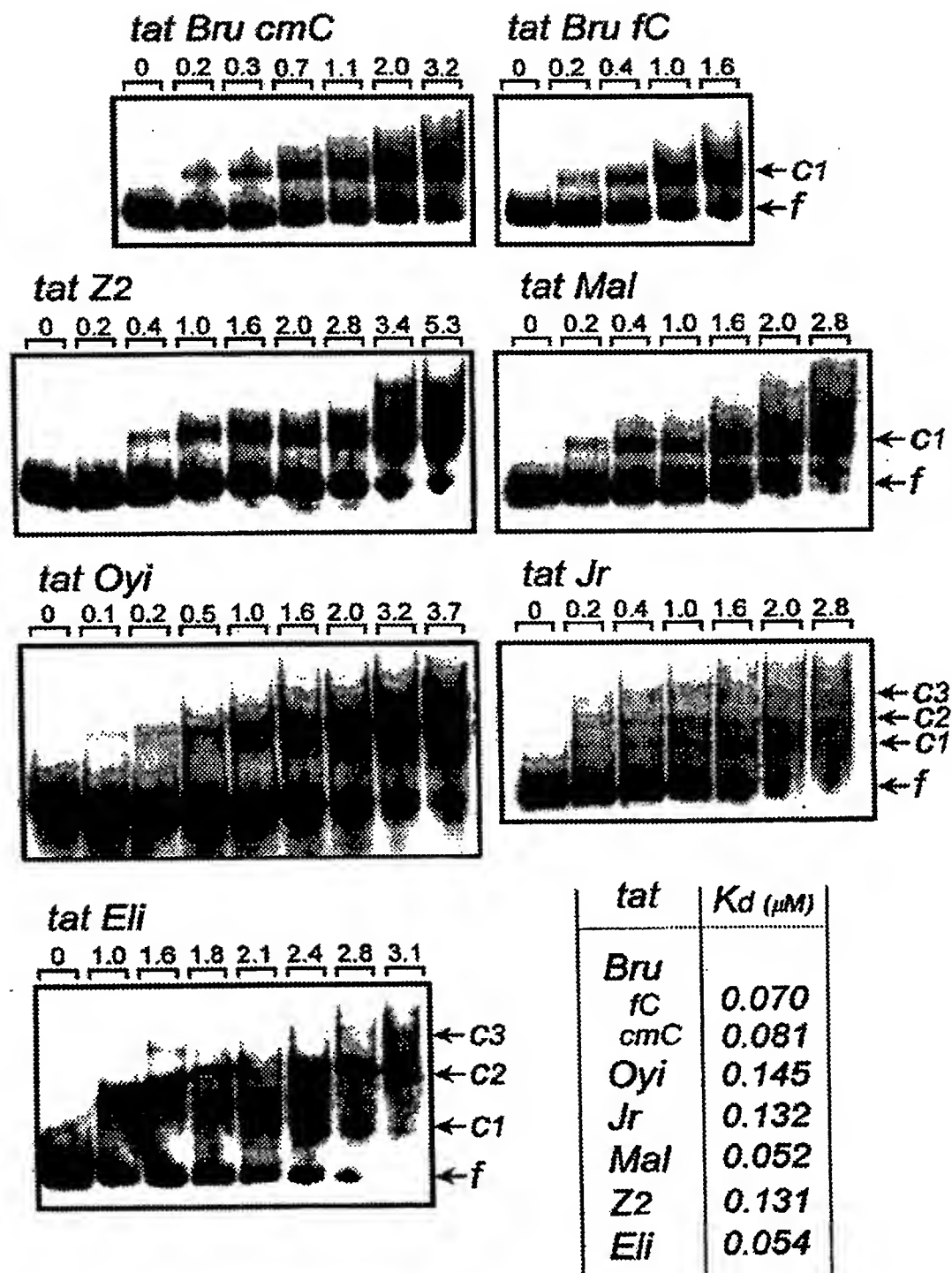
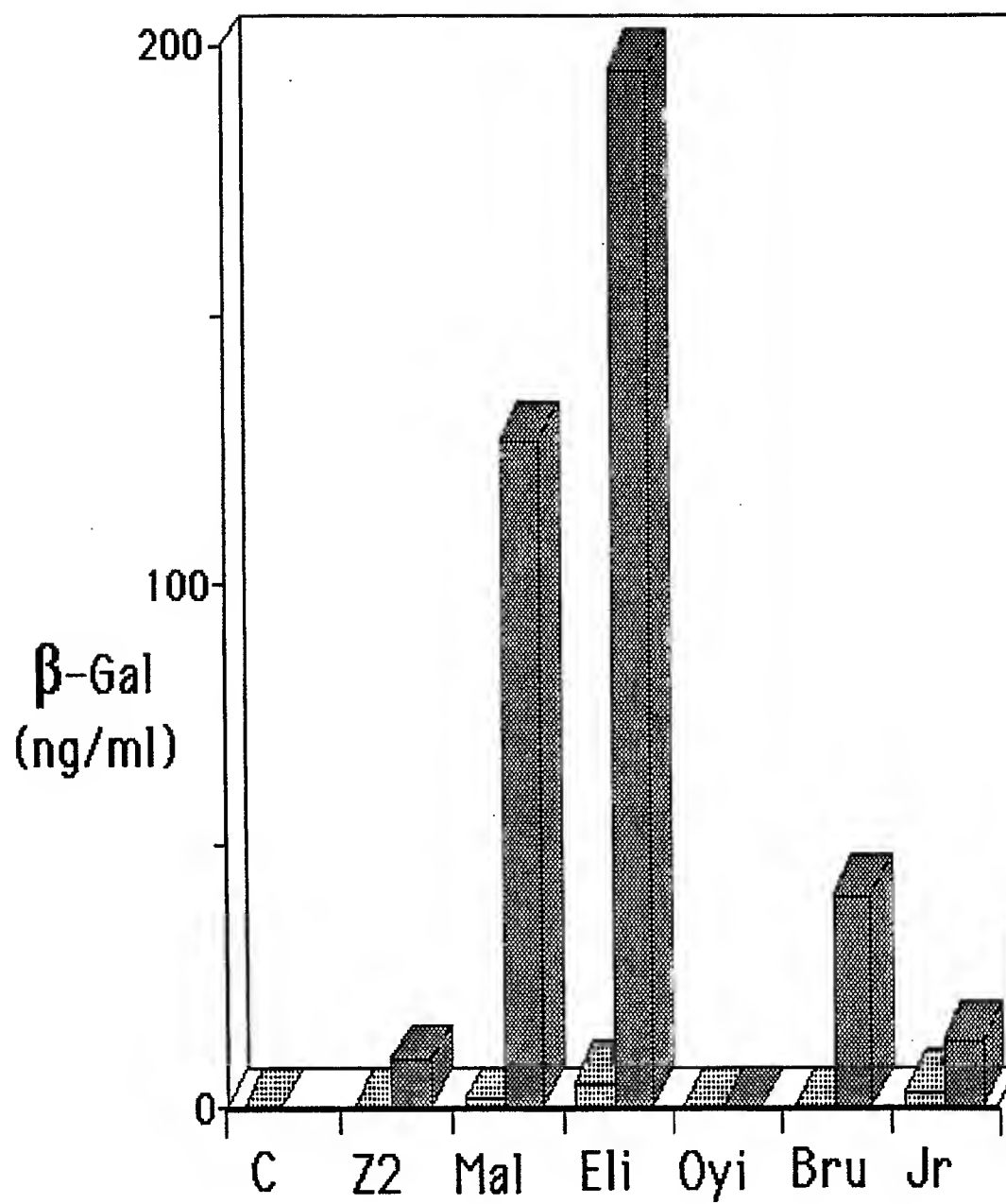
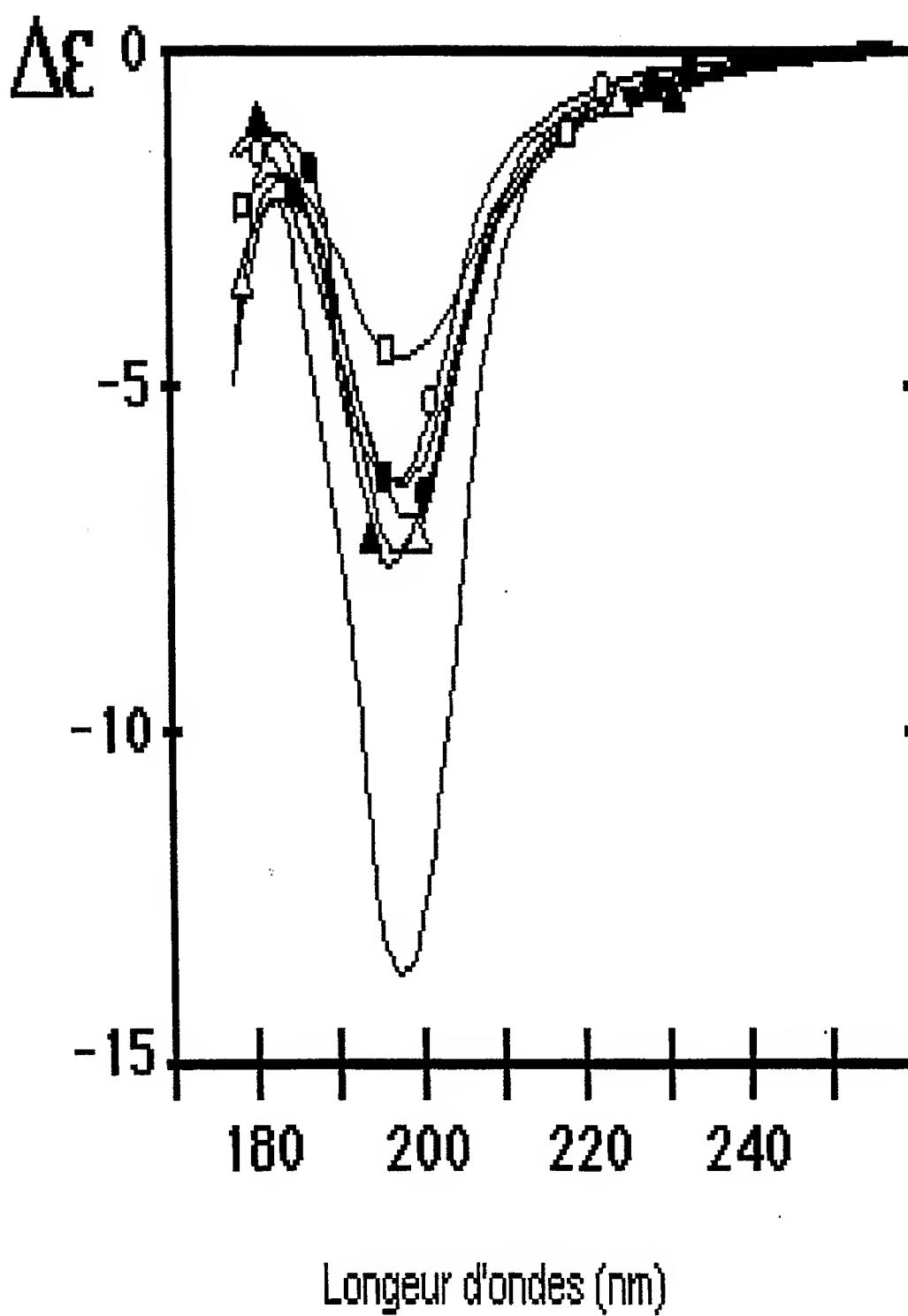
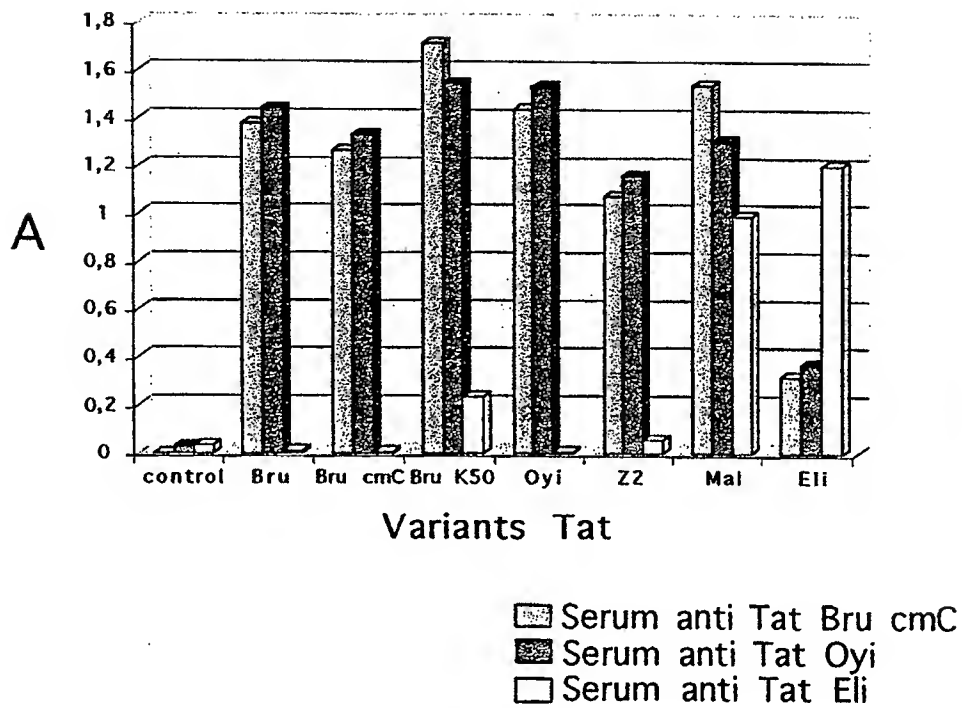


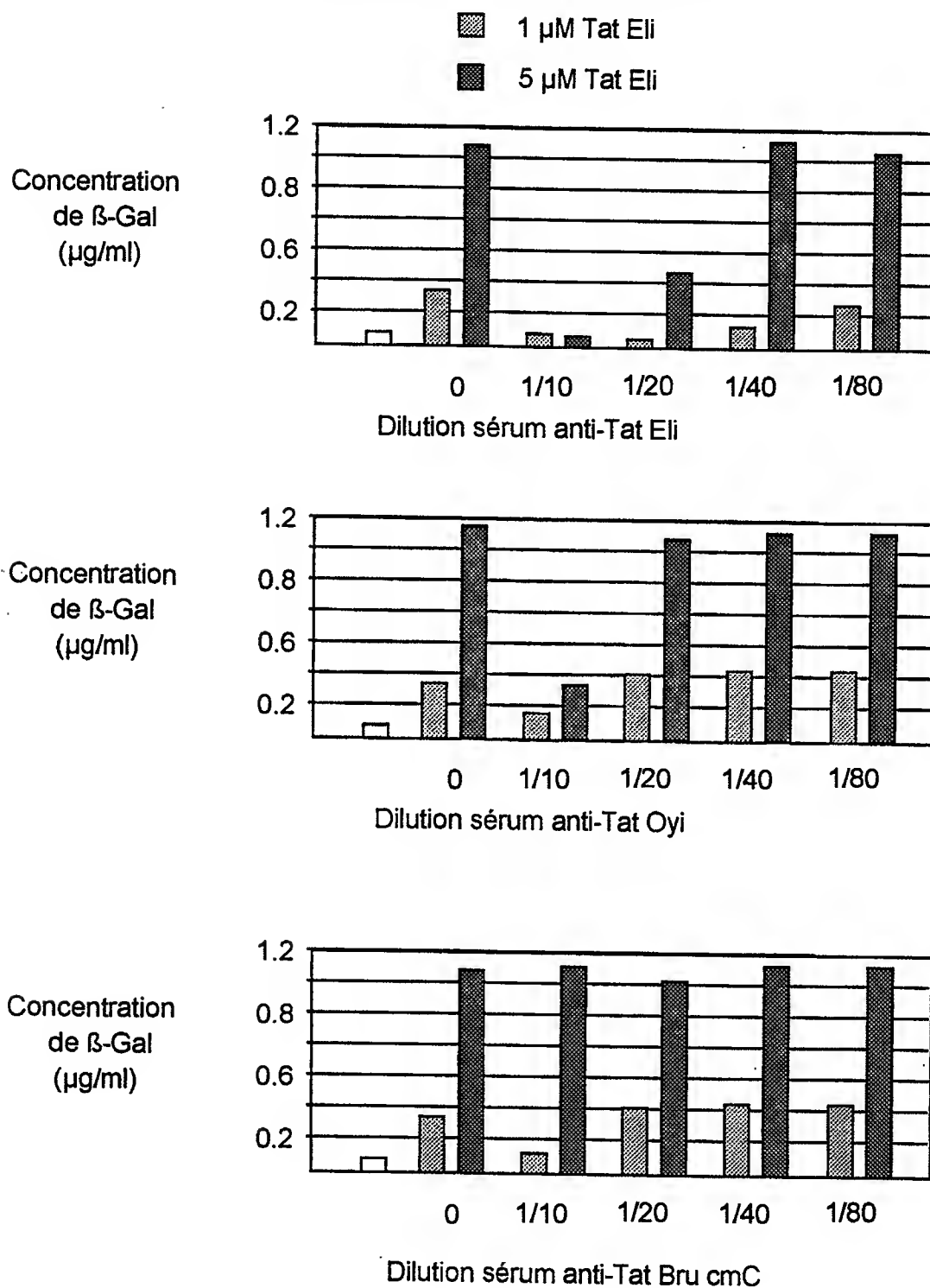
FIGURE 4

**FIGURE 5**

**FIGURE 6**

**FIGURE 7**

9/9

**Inhibition de la transactivation****FIGURE 8**

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
19 octobre 2000 (19.10.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 00/61067 A3**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>:  
A61K 39/21, C07K 14/16

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/00938

(22) Date de dépôt international: 12 avril 2000 (12.04.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:  
99/04610 13 avril 1999 (13.04.1999) FR  
99/16633 29 décembre 1999 (29.12.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US):  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange,  
F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement): LORET, Erwann [FR/FR]; 1, boulevard des Îles d'Or, F-13009 Marseille (FR).

(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 29 mars 2001

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: ANTI-HIV 1 VACCINE COMPRISING THE ENTIRE OR PART OF THE TAT HIV-1 PROTEIN

(54) Titre: VACCIN ANTI-VIH-1 COMPRENANT TOUT OU PARTIE DE LA PROTEINE TAT DE VIH-1

(57) Abstract: The invention relates to an anti HIV 1 vaccine comprising the entire or part of the Tat HIV 1 protein, in addition to the identification of said protein in individuals affected by HIV. The Tat protein is a protein of the HIV1 Oyi variant.

(57) Abrégé: La présente invention a pour objet un vaccin anti-VIH-1 comprenant tout ou partie de la protéine Tat de VIH ainsi que la mise en évidence de cette protéine chez des individus infectés par le VIH. En particulier, la protéine Tat est celle du variant VIH-1 Oyi.



WO 00/61067 A3



**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 A61K39/21 C07K14/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, MEDLINE, PAJ, WPI Data, BIOSIS

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 891 994 A (GOLDSTEIN GIDEON) 6 April 1999 (1999-04-06) column 2, line 60 - column 3, line 4; claim 18 column 3, line 24 - line 26 column 4, line 36 - line 58 column 12, line 16 - line 57 ---	12, 14-17
X	DE 195 14 089 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 24 October 1996 (1996-10-24) column 1, line 17 - line 28; claim 1 --- -/--	16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 September 2000

Date of mailing of the international search report

18/10/2000

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Charles, D

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GOLDSTEIN G: "HIV - 1 Tat protein as a potential AIDS vaccine." NATURE MEDICINE, (1996 SEP) 2 (9) 960-4. REF: 34, XP002129594 page 961, column 2, paragraph 1 - paragraph 2	1
X	page 962, column 2, paragraph 1 page 963, column 1, paragraph 5 -column 2, paragraph 2	16
X,P	PELOPON ESE J M JR ET AL: "Full peptide synthesis, purification, and characterization of six Tat variants. Differences observed between HIV-1 isolates from Africa and other continents." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1999 APR 23) 274 (17) 11473-8., XP002129596 page 11473, column 2, paragraph 4 page 11477, column 1, paragraph 1 -column 2, paragraph 1	1-7, 10-18
X,P	LEFEVRE E A ET AL: "Cutting edge: HIV-1 Tat protein differentially modulates the B cell response of naive, memory, and germinal center B cells." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1999 AUG 1) 163 (3) 1119-22., XP002129595 page 1119, column 2, paragraph 2 page 1122, column 1, paragraph 2 - paragraph 3	1-5, 10-17
X,P	CASELLI E ET AL: "DNA immunization with HIV - 1 tat mutated in the trans activation domain induces humoral and cellular immune responses against wild-type Tat." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1999 MAY 1) 162 (9) 5631-8., XP002129597 page 5632, column 1, paragraph 1 - paragraph 2 page 5632, column 2, paragraph 2 page 5633, column 2, paragraph 1 page 5635, column 1, paragraph 1 -page 5636, column 1, paragraph 2	1-4,6,8, 10-12, 14-17
	--- -/--	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	T. HUET ET AL.: "A HIGHLY DEFECTIVE HIV-1 STARIN ISOLATED FROM A HEALTHY GABONESE INDIVIDUAL PRESENTING AN ATYPICAL WESTERN BLOT" AIDS, vol. 3, 1989, pages 707-715, XP000867752 cited in the application page 708, column 1, paragraph 1 page 712, column 2, paragraph 1 - paragraph 2 ---	1-5, 10, 11
A	H. LE BUANEC ET AL.: "A PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC AIDS VACCINE CONTAINING AS A COMPONENT THE INNOCUOUS TAT TOXOID" BIOMED & PHARMACOTHER, vol. 52, 1998, pages 431-435, XP000867754 cited in the application the whole document ---	1-3, 12, 14
A	US 5 889 175 A (MEHTALI MAJID ET AL) 30 March 1999 (1999-03-30) column 1, line 5 - line 12; claims 1,9-11; table 1 column 2, line 23 - line 37 column 3, line 1 - line 16 column 3, line 27 - line 35 column 3, line 48 -column 4, line 47 column 7, line 53 -column 8, line 15 ---	1-3, 10
A	GREGOIRE C J ET AL: "Conformational heterogeneity in two regions of TAT results in structural variations of this protein as a function of HIV-1 isolates." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1996 SEP 13) 271 (37) 22641-6., XP002129593 cited in the application page 22641, column 2, paragraph 1 -page 22642, column 1, paragraph 1 page 22645, column 1, paragraph 1 ---	1-5, 10
A	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1995 RE M C ET AL: "Effect of antibody of HIV-1 tat protein on viral replication in vitro and progression of HIV-1 disease in vivo." Database accession no. PREV199698593925 XP002148917 abstract & JOURNAL OF ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROMES AND HUMAN RETROVIROLOGY, vol. 10, no. 4, 1995, pages 408-416, ISSN: 1077-9450 ---	1, 15-17

-/--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>           DATABASE BIOSIS 'Online!            BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,            PHILADELPHIA, PA, US; 1990            BRAKE D A ET AL: "CHARACTERIZATION OF            MURINE MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE TAT            PROTEIN FROM HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS            TYPE 1"            Database accession no. PREV199089070184            XP002148918            abstract            &amp; JOURNAL OF VIROLOGY,            vol. 64, no. 2, 1990, pages 962-965,            ISSN: 0022-538X            -----         </p>	15-17

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5891994 A	06-04-1999	AU 8392798 A EP 0994724 A WO 9902185 A	08-02-1999 26-04-2000 21-01-1999
DE 19514089 A	24-10-1996	WO 9632646 A EP 0820595 A JP 11503524 T	17-10-1996 28-01-1998 26-03-1999
US 5889175 A	30-03-1999	FR 2700169 A AU 668441 B AU 5280393 A CA 2112652 A EP 0614980 A JP 6234791 A	08-07-1994 02-05-1996 14-07-1994 05-07-1994 14-09-1994 23-08-1994

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 A61K39/21 C07K14/16

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  
EPO-Internal, MEDLINE, PAJ, WPI Data, BIOSIS

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 891 994 A (GOLDSTEIN GIDEON) 6 avril 1999 (1999-04-06) colonne 2, ligne 60 - colonne 3, ligne 4; revendication 18 colonne 3, ligne 24 - ligne 26 colonne 4, ligne 36 - ligne 58 colonne 12, ligne 16 - ligne 57	12, 14-17
X	DE 195 14 089 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 24 octobre 1996 (1996-10-24) colonne 1, ligne 17 - ligne 28; revendication 1	16



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 septembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18/10/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Charles, D

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	GOLDSTEIN G: "HIV - 1 Tat protein as a potential AIDS vaccine." NATURE MEDICINE, (1996 SEP) 2 (9) 960-4. REF: 34, XP002129594	1
X	page 961, colonne 2, alinéa 1 - alinéa 2 page 962, colonne 2, alinéa 1 page 963, colonne 1, alinéa 5 -colonne 2, alinéa 2	16
X,P	PELOPON ESE J M JR ET AL: "Full peptide synthesis, purification, and characterization of six Tat variants. Differences observed between HIV-1 isolates from Africa and other continents." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1999 APR 23) 274 (17) 11473-8., XP002129596 page 11473, colonne 2, alinéa 4 page 11477, colonne 1, alinéa 1 -colonne 2, alinéa 1	1-7, 10-18
X,P	LEFEVRE E A ET AL: "Cutting edge: HIV-1 Tat protein differentially modulates the B cell response of naive, memory, and germinal center B cells." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1999 AUG 1) 163 (3) 1119-22., XP002129595 page 1119, colonne 2, alinéa 2 page 1122, colonne 1, alinéa 2 - alinéa 3	1-5, 10-17
X,P	CASELLI E ET AL: "DNA immunization with HIV - 1 tat mutated in the trans activation domain induces humoral and cellular immune responses against wild-type Tat." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1999 MAY 1) 162 (9) 5631-8., XP002129597 page 5632, colonne 1, alinéa 1 - alinéa 2 page 5632, colonne 2, alinéa 2 page 5633, colonne 2, alinéa 1 page 5635, colonne 1, alinéa 1 -page 5636, colonne 1, alinéa 2	1-4,6,8, 10-12, 14-17
	-/--	

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	T. HUET ET AL.: "A HIGHLY DEFECTIVE HIV-1 STARIN ISOLATED FROM A HEALTHY GABONESE INDIVIDUAL PRESENTING AN ATYPICAL WESTERN BLOT" AIDS, vol. 3, 1989, pages 707-715, XP000867752 cité dans la demande page 708, colonne 1, alinéa 1 page 712, colonne 2, alinéa 1 - alinéa 2 ---	1-5,10, 11
A	H. LE BUANEC ET AL.: "A PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC AIDS VACCINE CONTAINING AS A COMPONENT THE INNOCUOUS TAT TOXOID" BIOMED & PHARMACOTHER, vol. 52, 1998, pages 431-435, XP000867754 cité dans la demande le document en entier ---	1-3,12, 14
A	US 5 889 175 A (MEHTALI MAJID ET AL) 30 mars 1999 (1999-03-30) colonne 1, ligne 5 - ligne 12; revendications 1,9-11; tableau 1 colonne 2, ligne 23 - ligne 37 colonne 3, ligne 1 - ligne 16 colonne 3, ligne 27 - ligne 35 colonne 3, ligne 48 -colonne 4, ligne 47 colonne 7, ligne 53 -colonne 8, ligne 15 ---	1-3,10
A	GREGOIRE C J ET AL: "Conformational heterogeneity in two regions of TAT results in structural variations of this protein as a function of HIV-1 isolates." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1996 SEP 13) 271 (37) 22641-6., XP002129593 cité dans la demande page 22641, colonne 2, alinéa 1 -page 22642, colonne 1, alinéa 1 page 22645, colonne 1, alinéa 1 ---	1-5,10
A	DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1995 RE M C ET AL: "Effect of antibody of HIV-1 tat protein on viral replication in vitro and progression of HIV-1 disease in vivo." Database accession no. PREV199698593925 XP002148917 abrégé & JOURNAL OF ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROMES AND HUMAN RETROVIROLOGY, vol. 10, no. 4, 1995, pages 408-416, ISSN: 1077-9450 --- -/-	1,15-17



C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne!  BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,  PHILADELPHIA, PA, US; 1990  BRAKE D A ET AL: "CHARACTERIZATION OF  MURINE MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE TAT  PROTEIN FROM HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS  TYPE 1"  Database accession no. PREV199089070184  XP002148918  abrégé  &amp; JOURNAL OF VIROLOGY,  vol. 64, no. 2, 1990, pages 962-965,  ISSN: 0022-538X</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	15-17

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5891994 A	06-04-1999	AU 8392798 A	08-02-1999
		EP 0994724 A	26-04-2000
		WO 9902185 A	21-01-1999
DE 19514089 A	24-10-1996	WO 9632646 A	17-10-1996
		EP 0820595 A	28-01-1998
		JP 11503524 T	26-03-1999
US 5889175 A	30-03-1999	FR 2700169 A	08-07-1994
		AU 668441 B	02-05-1996
		AU 5280393 A	14-07-1994
		CA 2112652 A	05-07-1994
		EP 0614980 A	14-09-1994
		JP 6234791 A	23-08-1994

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
19 octobre 2000 (19.10.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 00/61067 A3**

(51) Classification internationale des brevets?:  
A61K 39/21, C07K 14/16

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/00938

(22) Date de dépôt international: 12 avril 2000 (12.04.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:  
99/04610 13 avril 1999 (13.04.1999) FR  
99/16633 29 décembre 1999 (29.12.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US):  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange,  
F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement): LORET, Erwann [FR/FR]; 1, Boulevard des Îles d'Or, F-13009 Marseille (FR).

(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avec revendications modifiées.

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 29 mars 2001

Date de publication des revendications modifiées: 10 mai 2001

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: ANTI-HIV 1 VACCINE COMPRISING THE ENTIRE OR PART OF THE TAT HIV-1 PROTEIN

(54) Titre: VACCIN ANTI-VIH-1 COMPRENANT TOUT OU PARTIE DE LA PROTEINE TAT DE VIH-1

(57) Abstract: The invention relates to an anti HIV 1 vaccine comprising the entire or part of the Tat HIV 1 protein, in addition to the identification of said protein in individuals affected by HIV. The Tat protein is a protein of the HIV1 Oyi variant.

(57) Abrégé: La présente invention a pour objet un vaccin anti-VIH-1 comprenant tout ou partie de la protéine Tat de VIH ainsi que la mise en évidence de cette protéine chez des individus infectés par le VIH. En particulier, la protéine Tat est celle du variant VIH-1 Oyi.

WO 00/61067 A3

**REVENDEICATIONS MODIFIEES**

[reçues par le bureau international le 8 décembre 2000 (08.12.00);  
revendication 12 modifiée; revendication 14 supprimée;  
revendications 15-18 renumérotées 14-17 (2 pages)]

que la région Arg-Gly-Asp située à l'extrémité C-terminale de Tat est modifiée.

12. Procédé de préparation d'anticorps polyclonaux anti-Tat aptes à reconnaître plusieurs variants de Tat, comprenant :

- l'immunisation d'un animal par injection d'une protéine Tat telle que définie dans la revendication 6 ou d'une partie de cette protéine Tat associée à un adjuvant de la réponse immunitaire,
- purification des anticorps spécifiques contenus dans le sérum des animaux immunisés.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la protéine Tat ou partie de la protéine Tat utilisée dans l'étape d'immunisation correspond au variant Oyi ou Bru cmC.

14. Procédé de mise en évidence de la présence de la protéine Tat ou d'une partie de la protéine Tat dans un échantillon biologique, comprenant :

- la mise en contact dudit échantillon avec des anticorps anti-Tat capables de donner lieu à des complexes antigène-anticorps avec plusieurs variants de Tat,
- la détermination de la présence des complexes antigène-anticorps.

15. Trousse de diagnostic de l'infection par le VIH par la détermination de la présence de la protéine Tat ou d'une partie de la protéine Tat dans un échantillon biologique, comprenant :

- des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à la réaction immunologique,
- des réactifs permettant la détection des complexes antigène-anticorps produits par la réaction immunologique,
- éventuellement, un échantillon biologique de référence (témoin négatif) dépourvu d'antigène,
- éventuellement, un échantillon biologique de référence (témoin positif) contenant une quantité prédéterminée d'antigène.

16. Trousse selon la revendication 15, dans laquelle les réactifs pour la

constitution du milieu propice à la réaction immunologique comprennent des anticorps tels que définis dans la revendication 14.

17. Procédé de synthèse d'un variant Tat tel que défini dans l'une des revendications 1 à 5, 10 et 11, caractérisé en ce qu'il met en œuvre des groupements protecteurs de type FMOC, de manière préférentielle de type fastFMOC.